

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  <b>C12N 15/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/60107</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 25. November 1999 (25.11.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/01585  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. Mai 1999 (18.05.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 24 307.3                      20. Mai 1998 (20.05.98)                      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BÄUMLEIN, Helmut [DE/DE]; Mehringer Strasse 63, D-06449 Aschersleben (DE). GANAL, Martin [DE/DE]; Reuthestrasse 9, D-06507 Rieder (DE). HERBIK, Alexandra [DE/DE]; Pradel-Strasse 8, D-13187 Berlin (DE). LING, Hong-Qing [CN/DE]; Hans-Stubbe-Strasse 15, D-06466 Gatersleben (DE). MOCK, Hans-Peter [DE/DE]; Unterstrasse 14, D-06469 Nachterstedt (DE). STEPHAN, Udo [DE/DE]; Hans-Stubbe-Strasse 16, D-06466 Gatersleben (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> NICOTIANAMINE SYNTHASE GENES, ISOLATION AND USE THEREOF  <b>(54) Bezeichnung:</b> NICOTIANAMIN-SYNTHASE-GENE, IHRE ISOLIERUNG UND IHRE VERWENDUNG  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to nicotianamine synthase genes, the isolation and use thereof. The invention can be used in agriculture and environmental protection. According to the invention, nicotianamine synthases and the genes coding for the latter are isolated and sequenced. Special embodiment examples are based on isolation from barley or tomatoes.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft die Nicotianamin-Synthase-Gene, ihre Isolierung und ihre Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Landwirtschaft und der Umweltschutz. Erfindungsgemäß werden Nicotianamin-Synthasen und die für sie kodierenden Gene isoliert und sequenziert. Spezielle Ausführungsbeispiele gehen von der Isolierung aus Gerste bzw. aus Tomate aus.		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Nicotianamin-Synthase-Gene, ihre Isolierung und ihre Verwendung

Die Erfindung betrifft die Nicotianamin-Synthase-Gene, ihre Isolierung und ihre Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Landwirtschaft und der Umweltschutz.

Die nichtproteinogene Aminosäure Nicotianamin wurde zuerst aus Blättern von Tabak (*Nicotiana tabacum*; Tetrahedron Lett. 22, 2017-2020 [1971]) und Luzerne (*Medicago sativa*; Phytochemistry 19, 2295-2297 [1980]) isoliert. Sie kommt in allen untersuchten mehrzelligen Pflanzen vor (Biochem. Physiol. Pflanzen 180, 557-563 [1985]). Nicotianamin ist eine entscheidende Komponente bei der Regulierung der pflanzlichen Eisen- und Schwermetallassimilation (J. Plant Nutr. 15, 1647-1665 [1992]; Physiol. Plant. 88, 522-529 [1993]). Nicotianamin ist in der Lage, die auxotrophe Tomatenmutante chloronerva phänotypisch zu normalisieren (Plant Sci. Lett. 32, 327-332 [1983]).

Die gezielte Kontrolle der Nicotianamin-Konzentration bietet vielfältige und aussichtsreiche Möglichkeiten für die Beeinflussung des pflanzlichen Mineralstoffwechsels. Nicotianamin wird in Pflanzen aus S-Adenosyl-Methionin (SAM) synthetisiert, die Reaktion wird durch das Enzym Nicotianamin-Synthase katalysiert.

Die Erfindung hat das Ziel, die Nicotianamin-Konzentration in Pflanzen zu beeinflussen und damit positive Effekte auf den Mineralstoffwechsel hervorzurufen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, die Struktur der Nicotianamin-Synthase sowie der für sie kodierenden Gene zu ermitteln, Konstrukte für den

Transfer der Gene aufzubauen und schließlich transgene Pflanzen mit veränderter Nicotianamin-Produktion herzustellen.

Ein weiteres Ziel besteht darin, das chemosynthetisch schwer zugängliche Nicotianamin auf biotechnologischem Wege zu gewinnen.

Die Aufgabe der Erfindung wird gemäß den Ansprüchen 1-14 gelöst.

Ausgangspunkt der Erfindung ist die Isolierung und Sequenzierung der Nicotianamin-Synthasen sowie der für sie kodierenden Gene. Diese Sequenzen werden in Rahmen der vorliegenden Erfindung beansprucht.

Die Aminosäuresequenz der Nicotianamin-Synthase aus Gerste umfaßt Aminosäuren folgender Sequenz:

MDAQNKEVDALVQKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLGSEA  
QEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMDLAADFNDPLDHLGMFPYYSNYINLSKLEYELLARYV  
PGRHRPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPDAMFDNYDLCSAANDRASKLFRADKDVGAR  
MSFHTADVADLTGELAAVDVVFLAALVGMAAEDKTKVIAHLGAHMADGAALVVRSAHGHV  
GFLYPIVDPODIGRGGFEVLAVCHPDDDVVNSVIIAHKSKDVHANERPNGVVDSTRGAVP  
VVSPPCRFGEMVADVTHKREEFTNAEVA

Die Aminosäuresequenz der Nicotianamin-Synthase aus Tomate umfaßt Aminosäuren folgender Sequenz:

MVCPNSNPVVEKVCELYEQISRLENLSPSKDVNVLFDTLVHTCMPNPIDVSKLCQKIQEIRSHLIKLC  
GOAEGLLSHFSKILSSYENPLQHLHIFPYFDNYIKLSLLEYNILTKNTTNIPKKIAFIGSGPLPLTSLVLA  
TKHLKTTCFHNYDIDVDANFMASALVAADPDMSSRMTEHTADVMDVTCALKDYDVFLAALVGMDK  
EDKVKVVDHLAKYMSPGATMLRSHAGARAFLYPVLDPRDLRGFEVLSVYHPTDEVINSVIIARKLPV  
PSVPLLDGLGAYVLPSKCACAEIHAFNPLNKMNLVEEFALEE

Die sie kodierenden DNA-Sequenzen haben folgende Basenfolgen:

a) in Gerste

CATCCACCACTCCACTTCGCTCCTGTGCCTCAGGTAGCCACAACATACAGTATTAAATG  
 GATGCCCAGAAACAAGGAGGTTGATGCCCTGGTCCAGAAGATCACCGGCTCCACGCCGCC  
 ATCGCCAAGCTGCCGTCCCTCAGCCCATCACCGACGTGACGCGCTCTTCACCGACCTG  
 GTCACCGCGTGCGTCCCCCGAGCCCCGTAGACGTGACCAAGCTCGGGTCGGAGGCGCAG  
 GAGATGCGGGAGGGCCTCATCCGCTCTGCTCCGAGGCCGAGGGGAAGCTGGAGGCGCAC  
 TACTCCGACATGCTGGCCGCTTCGACAACCCGCTCGACCACCTCGGCATGTTCCCCTAC  
 TACAGCAACTACATCAACCTCAGCAAGCTGGAGTACGAGCTCCTGGCGCGCTACGTGCCG  
 GGGCGGCATCGCCCGGCCCGCGTCCGCTTCATCGGGTCCGGCCCGCTGCCGTTACGTCC  
 TACGTCTCGCCGCTCGCCACCTGCCCGACGCCATGTTGACAACCTACGACCTGTGTAGC  
 GCGGCCAACGACCGTGCGAGCAAGCTGTTCCGCGCGGACAAGGACGTGGGCGCCCGCATG  
 TCTTTCCACACCGCCGACGTAGCGGACCTCACCGGCGAGCTCGCCGCGTACGACGTCGT  
 TTCCTGGCCGCGCTCGTGGGCATGGCTGCCGAGGACAAGACCAAGGTGATCGCGCACCTC  
 GCGCGCACATGGCGGACGGGGCGGCCCTCGTCTGCGCAGTGGCAGCGGCACGTGGGG  
 TTCCTCTACCCGATCGTTCGATCCCCAGGACATCCGTCGAGGCGGGTTGAGGTGCTGGCC  
 GTGTGTCACCCCGACGATGACGTGGTGAACCTCCGTTCATCATCGCACACAAGTCCAAGGAC  
 GTGCATGCCAATGAACGTCCCAACGGCGTGGTGGACAGTACGCGGGCGCGGTGCCGGTG  
 GTCAGCCCGCCGTGACGGTTCGGTGAGATGGTGGCGGACGTGACCCACAAGAGAGAGGAG  
 TTCACCAACGCGGAAGTGGCCTTCTGATCGTTGCGAGGGAATGAAAATGAAGGTGGACGT  
 GTGTGGTCAGCATCCATACGTGGCTGCCTGCTTCATCGCTTGCAATCGTACTACTACCTA  
 CCTATGCAGTTCAAGTCATGTGTTGTCAATGTAAGTGTGATGTTTACACTAGTCTATGAA  
 AGGCAGGGCAGACGAGGGTAGTGTGCCAAGTAAAGTGTGTATTATAGGTGTAAGTGTT  
 GAGAATAAGACCATTTTTTGTTCACAAAAA

b) in Tomate

Start

ATTTTTTACAATTCCAAGAAAAGAAAACAATTTGGTCATAGTGTGCAATGGTGTGCCCAAATAG  
 CAATCCAGTAGTAGAAAAAGTATGTGAATTATGAACAAATTTCAAGATTGGAGAACCTTAGCC  
 CTTCCAAAGATGTCAACGTATTGTTACAGATCTTGTCCACACGTGCATGCCTCCTAATCCCATT  
 GATGTCTCTAAGCTCTGTCAAAAAATTCAAGAAATTAGGTCTCATCTCATAACTTTGTGGTCA  
 AGCTGAGGGGACTTTTAGAGTCACACTTTTCTAAAATTCTTTCCTCCTATGAAAACCCCTTCAAC  
 ATCTTCACATTTTCCCATATTTTGACAATTACATCAAACCTCAGCTTACTTGAGTACAACATCCTTA  
 CTAAAAACACAACAAATATCCCTAAAAAAATTGCATTTATTGGATCAGGCCACTACCACTTACCT  
 CACTTGTTTTAGCTACCAAACATCTTAAACCACTTGTTTTCACAACTATGACATTGATGTGGATG  
 CTAATTTTCATGGCGTCCGCCCTTGTTGGGCGCGGATCCAGACATGTCCAGCCGTATGACTTTTCA  
 TACGGCTGACGTGATGATGTAACGTGTGCCTTGAAAGACTACGATGTAGTCTTTCTGGCCGCG  
 TTAGTTGGTATGGACAAAGAGGATAAAGTTAAGGTGGTTGATCATCTAGCTAAATACATGTCTCC  
 AGGGGCTACCTGATGCTTAGAAGTGCACATGGTGCACGTGCTTTTCTATACCCTGTCTAGAT  
 CCTCGGGATCTACGAGGATTTGAGGTACTATCGGTGTACCATCCTACAGATGAAGTGATCAATT  
 CTGTAATAATTGCAAGAAAATTGCCAGTTCCTAGTGTTCCTACTTGTGATTGGGTGCCTAT  
 GTGTTACCTAGCAAATGTGCTTGTGCTGAGATTGATGCTTTCAATCCACTCAATAAGATGAATCT  
 GGTGGAAGAATTTGCTCTGGAGGAGTGAAGTGAAGTTATGTCTTGTGTTATGTTTCAATAATAAT  
 ATTACTGGAGCACTTCCATTTTTATTGTAATTTGTATCCCTAACTGTTTTATCAGTGTGTCTATT  
 TGTGTGTCTCAAACTACAAGAAAAAAGAAAAAGGCATGAGGCCTTTTGTTAATCTTACAAATTTA  
 TCTAATATCTCGTGCCCA

Neben den angegebenen Aminosäure- und DNA-Sequenzen gehören auch deren Fragmente, Varianten und Mutanten zum Umfang der vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen eröffnen eine grundlegend neue Möglichkeit, den pflanzlichen Mineralstoffwechsel zu beeinflussen. Sie können mittels geeigneter Vektoren in das Genom von Pflanzen übertragen werden. Das führt zu transgenen Pflanzen mit Überproduktion von Nicotianamin und gesteigerter Spurenelement-Effizienz (vor allem Eisen, Kupfer, Zink).

Grundsätzlich sind die neuen DNA-Sequenzen für einen Transfer in sämtliche Pflanzen geeignet. Bevorzugt ist jedoch der Einsatz der Nicotianamin-Synthase-DNA aus dikotylen Pflanzen für die gleichen oder für weitere dikotyle Pflanzen, beispielsweise der DNA aus der Tomate für Tomaten, Kartoffeln, Zuckerrüben, Soja usw.

Der Einsatz von aus monokotylen Pflanzen erhaltener DNA ist demzufolge für die gleichen oder weitere monokotyle Pflanzen bevorzugt, beispielsweise der DNA aus Gerste für Gerste und für weitere Getreidearten.

Die Übertragung zusätzlicher Nicotianamin-Synthase-Genkopien in das Genom von Pflanzen und ihre Organ- und Ontogenese-spezifische Expression führt durch Erhöhung der Nicotianamin-Konzentration zu einer Optimierung der Verteilung der o. g. Spurenelemente und damit zu verstärkter Vitalität, höherer Biomasseproduktion und somit letztlich zu besseren Erträgen. Kultursorten von z. B. Getreiden können so mit höherer Effizienz in Gebieten mit Mangelböden angebaut werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht im Absenken der Nicotianamin-Konzentration in den Pflanzen, was vorzugsweise durch den Aufbau von Nicotianamin-Synthase-antisense-Konstruktionen zur Phytoremediation erfolgt (Suppression der Nicotianamin-Synthase-Aktivität).

Mit Hilfe solcher Konstrukte und deren Transfer in die Pflanzen können die Wildtyp-gemäßen Nicotianamin-Konzentrationen stufenweise abgesenkt werden, um die Aufnahmereaktionen der Wurzel für solche Schwermetalle zu aktivieren, mit denen Nicotianamin Komplexe zu bilden vermag, also Cu, Ni, Co, Zn, Fe, Mn und andere. Die daraus folgendende Überaufnahme aus dem Boden kann zur Sanierung von Schwermetall-belasteten Böden genutzt werden.

Das Absenken der Nicotianamin-Konzentration in Pflanzen kann auch durch homologe Rekombination der Nicotianamin-Synthase erfolgen.

Die mit der Erfindung zur Verfügung gestellten Aminosäuresequenzen gemäß Anspruch 4-6 sind ferner als Ausgangspunkt für ein Herbizidtargeting geeignet. Potentielle Herbizide werden getestet, ob sie die Enzym-Aktivität der Nicotianamin-Synthase hemmen. Der Ausfall der Enzymaktivität führt durch Disorganisation des Mineralstoffwechsels zu semiletalen Pflanzen, die unter Feldbedingungen keine Entwicklungschancen gegenüber den mit einer entsprechenden Herbizidresistenz ausgestatteten Kulturpflanzen haben.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Erfindung besteht darin, daß das chemosynthetisch bisher höchstens im mg-Bereich zugängliche Nicotianamin jetzt auf biotechnologischem Wege gewonnen werden kann. Notwendig ist dazu der Transfer des Nicotianamin-Synthase-Gens in einen für die Produktion geeigneten Mikroorganismus, z. B. E. coli oder Bac. subtilis. Das damit in ausreichenden Mengen herstellbare Nicotianamin wird in der Medizin (u.a. als Angiotensin I-Konversionsenzym-Inhibitor, d.h. als Blutdrucksenker) und als Leitstruktur für weitere Synthesen eingesetzt. Diese neue Möglichkeit erlaubt auch erstmals die gezielte Produktion von speziellen Stereoisomeren des Nicotianamins, wie sie für die volle biologische Aktivität notwendig sind.

Gegenstand der Erfindung sind auch transgene Pflanzen, die DNA-Sequenzen enthalten, welche die Nicotianamin-Synthase kodieren, ebenso wie Pflanzen, die Antisense-Sequenzen gegen die in den Pflanzen vorhandenen Nicotianamin-Synthase-Gene beinhalten.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

#### Beispiel 1: Nicotianamin-Synthase aus Gerste

Wurzelgewebe von Gerstenpflanzen, die unter Eisenmangel kultiviert wurden, wird unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die Extraktion der Proteine mit einem speziellen Extraktionspuffer, dem verschiedene Protease-Inhibitoren zugesetzt sind, und alle anschließenden Isolierungsschritte geschehen bei 0°C. Mittels Hydrophober Interaktions-Chromatographie, Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sephacel), Hydrophober Interaktions-Chromatographie, Anionenaustausch-Chromatographie (Res<sup>TM</sup>Q), Hydroxylapatit-Chromatographie und Gelfiltration wird ein Enzymextrakt mit etwa 140-facher Aufreinigung erhalten.

Die Proteinfraction mit Nicotianamin-Synthase-Aktivität enthält das SAM-bindende 'Polypeptid B'. Dessen Reindarstellung und die Bestimmung partieller Aminosäuresequenzen führt zur Ableitung sequenzspezifischer Oligonukleotide. Mit Hilfe der RACE (rapid amplification of cDNA ends)-Technik wurde ein Teil der Nicotianamin-Synthase-Gensequenz aus Gerste isoliert. Eine Datenbanksuche findet kein bereits beschriebenes ähnliches Gen, mit Ausnahme zweier anonymer, aus dem Genomprojekt resultierender Arabidopsis-Sequenzen. Die gefundene Nicotianamin-Synthase-Sequenz repräsentiert demnach ein neues Pflanzengen.



Beispiel 2: Aktivitätsbestimmung der Nicotianamin-Synthase

Zur Aktivitätsbestimmung der Nicotianamin-Synthase, besonders zur Kontrolle der Reinigungsschritte bei Isolierung des Enzyms, wurde folgender Assay entwickelt:

Nach Homogenisieren von 3 g Pflanzenmaterial (Frischgewicht) unter flüssigem Stickstoff wurde das pulverisierte Material in 5 ml Extraktionspuffer (100 mM HEPES, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM KCl, 1 mM EDTA, 30 mM Dithiothreitol, 1.4  $\mu$ l Leupeptin, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 360, 0.2% (w/v) Rinderserumalbumin, 0.2% (w/v) Casein, 200  $\mu$ M S-Adenosyl-Methionin und 10  $\mu$ M E64 pH 8.2) aufgenommen. 2.5 ml des Überstandes wurden nach der Zentrifugation (13.000 g, 3 min, 4°C) auf eine PD10-Säule (Pharmacia) geladen, die vorher mit 12 ml Inkubationspuffer (50 mM Tris, 1mM EDTA, 3 mM Dithiothreitol, 50  $\mu$ M Methionin, 200  $\mu$ M S-Adenosyl-Methionin, 500  $\mu$ M ATP und 10 $\mu$ M E64, pH 8.7) äquilibriert wurde. Nach der Elution mit 3.5 ml Inkubationspuffer wurde der Proteinextrakt mittels Ultrafiltration konzentriert und für den Enzymtest eingesetzt. Die Bestimmung der Nicotianamin-Synthase-Aktivität erfolgte bei Tomate genauso wie bei Gerste. Ausgetauscht wurde lediglich der Proteasehemmstoff E64 gegen 0.1 mM 4-Amidinophenylmethansulfonylfluorid und 20  $\mu$ g/ml Antipain.

Die Enzymaktivität der Nicotianamin-Synthase wurde jeweils über die Produktmenge des aus 3 Molekülen S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}C$ ]methionin synthetisierten  $^{14}C$ -Nicotianamins quantifiziert. Unter Standardbedingungen erfolgte eine Inkubation von 50  $\mu$ l Extrakt mit 20  $\mu$ M  $^{14}C$ -S-Adenosyl-Methionin bei 30°C, pH 8.7, für 5 oder 10 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 99%-igem Methanol in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) abgestoppt und die Proben bis zur Quantifizierung bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor der

Dünnschichtchromatographie wurden die Proben aufgetaut und für 10 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert.

Die Trennung von S-Adenosyl-L-[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]methionin und  $^{14}\text{C}$ -Nicotianamin erfolgte dünnschichtchromatographisch. Zur Identifizierung des  $^{14}\text{C}$ -Nicotianamins wurde unmarkiertes Nicotianamin als Referenzsubstanz aufgetragen, das sich mit Ninhydrin anfärben läßt. Die Entwicklung der Chromatogramme auf Kieselgelplatten erfolgte entweder mit 1-Propanol/Wasser (7/8, v/v) oder mit Phenol/Butanol/Ameisensäure/Wasser (12/3/2/3 v/v). Die Quantifizierung des Reaktionsproduktes wurde mit einem Bio-Imaging Analyser Fuji BAS 2000 vorgenommen.

### Beispiel 3: Isolation der Nicotianaminsynthase aus der Tomate

Die Mutante *chloronerva* enthält kein Nicotianamin und ist eine semi-lethale Mutante. Zur Isolation des Genes für die Nicotianaminsynthase wurde ein marker-gestützter Ansatz gewählt. Hierzu wurde das *chloronerva*-Gen auf der genetischen Karte der Tomate auf Chromosom 1 lokalisiert. Das *chloronerva*-Gen liegt auf einer hochauflösenden genetischen Karte zwischen den zwei RFLP-Sonden CT224 und CT67. Ausgehend von dieser Information wurden für diese RFLP-Sonden die dazu gehörenden künstlichen Hefechromosomen (YACs) aus einer Bibliothek der Tomate isoliert. Die Analyse der Enden der YAC-Klone, welche mit der Sonde CT67 isoliert wurden, zeigen, daß die Enden zweier YACs (YAC156 und YAC403) eine Rekombination links bzw. rechts des Genes liegen. Das *chloronerva*-Gen liegt also zwischen diesen zwei Sonden. Ausgehend von diesen Enden (403AL und 156AR) wurde in einem zweiten Schritt ein Kosmidkontig in einem Transformationsvektor für die Region zwischen den Sonden 403AL und 156AR erstellt. Die Kosmide wurden dann in die *chloronerva*-Mutante transformiert und es konnte eine Komplementation der Mutante erreicht werden. Die Komplementation zeichnet sich dadurch aus, daß der semi-lethale Phänotyp der Mutante zum normalen Wildtyp komplementiert wird. Eine detaillierte Suche nach dem Gen in der komplementierenden DNS resultierte in der Identifikation einer cDNs und des dazugehörigen Genes, welches als Kandidat für das *chloronerva*-Gen in Frage kam. Diese cDNS zeigte keine signifikante Homologie mit bis dahin bekannten Genen und es konnte eine Punktmutation in der *chloronerva*-Mutante (Aminosäure 238) identifiziert werden. Die korrespondierende genomische Sequenz enthält keine Introns und entspricht damit der cDNS-Sequenz. Der Nachweis, daß dieses Gen für die Nicotianaminsynthase kodiert erfolgt durch einen enzymatischen Test. Die kodierende Sequenz der Nicotianaminsynthase wurde aus dem Wildtyp und der Mutante mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und in einen Expressionsvektor (pET12a) kloniert. Nach Transformation in *Escherichia coli* (Stamm 173, DE3) wurde die Expression des Genes induziert und das exprimierte Protein auf Nicotianaminsynthaseaktivität getestet. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Beispiel 2 dargestellt. Das Wildtypgen zeigt klare Nicotianaminsynthaseaktivität, wogegen das mutierte *chloronerva*-Gen keine Nicotianaminsynthaseaktivität zeigt. Diese Ergebnisse bestätigen, daß das *chloronerva*-Gen tatsächlich für die Nicotianaminsynthase kodiert.

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, kodierend Nicotianamin-Synthasen.

2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, kodierend Nicotianamin-Synthase aus Gerste, gekennzeichnet durch folgende Sequenz:

CATCCACCACTCCACTTCGCTCCTGTGCCTCAGGTAGCCACAACATACAGTATTTAAAATG  
GATGCCCCAGAACAAAGGAGGTTGATGCCCTGGTCCAGAAAGATCACCGGCCTCCACGCCGCC  
ATCGCCAAGCTGCCGTCCCTCAGCCCATCACCCGACGTCGACGCGCTCTTCACCGACCTG  
GTCACCGCGTGCCTCCCCCGAGCCCCGTAGACGTGACCAAGCTCGGGTCCGAGGCGCAG  
GAGATGCGGGAGGGCCTCATCCGCCTCTGCTCCGAGGCCGAGGGGAAGCTGGAGGCGCAC  
TACTCCGACATGCTGGCCGCCTTCGACAACCCGCTCGACCACCTCGGCATGTTCCCCTAC  
TACAGCAACTACATCAACCTCAGCAAGCTGGAGTACGAGCTCCTGGCGCGCTACGTGCCG  
GGGCGGCATCGCCCGGCCCGCGCTCGCGTTCATCGGGTCCGGCCCGCTGCCGTTTACGTCC  
TACGTCTCGCCGCTCGCCACCTGCCCGACGCCATGTTTCGACAACCTACGACCTGTGTAGC  
GCGGCCAACGACCGTGCAGCAAGCTGTTCCGCGCGGACAAGGACGTGGGCGCCCCGCATG  
TCTTTCCACACCGCCGACGTAGCGGACCTCACCGGCGAGCTCGCCGCGTACGACGTCTGTC  
TTCCTGGCCGCGCTCGTGGGCATGGCTGCCGAGGACAAGACCAAGGTGATCGCGCACCTC  
GGCGCGCACATGGCGGACGGGGCGGCCCTCGTCGTGCGCAGTGCACGCGGCACGTGGGG  
TTCCTCTACCCGATCGTCGATCCCCAGGACATCGGTGCGCAGGCGGGTTTGAGGTGCTGGCC  
GTGTGTCACCCCGACGATGACGTGGTGAACCTCCGTTCATCATCGCACACAAGTCCAAGGAC  
GTGCATGCCAATGAACGTCCCAACGGCGTGGTGGACAGTACGCGGGGCGCGGTGCCGGTG  
GTCAGCCCGCCGTGCAGGTTCCGGTGAGATGGTGGCGGACGTGACCCACAAGAGAGAGGAG  
TTCACCAACGCGGAAGTGGCCTTCTGATCGTTGCGAGGGAATGAAAATGAAGGTGGACGT  
GTGTGGTCAGCATCCATACGTGGCTGCCCTGCTTCATCGCTTGCAATCGTACTACTACCTA  
CCTATGCAGTTCAAGTCATGTGTTGTCAATGTAAGTGTGATGTTTACACTAGTCTATGAA  
AGGCAGGGCAGACGAGGGTAGTGTGCCAAGTAAAAGTGTGTCATTATAGGTGTAAGTGTT  
GAGAATAAGACCATTTTTTGTTCACAAAAAAAAAAAAAAAAA

sowie Fragmente, Mutanten und Varianten dieser Sequenz.

3. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, kodierend Nicotianamin-Synthase aus Tomate, gekennzeichnet durch folgende Sequenz:

start

ATTTTTACAATTCCAAGAAAAGAAAACAATTTGGTCATAGTGTGGA<sup>→</sup>ATGGTGTGCCCCAAATAG  
 CAATCCAGTAGTAGAAAAAGTATGTGAATTATATGAACAAATTTCAAGATTGGAGAACCTTAGCC  
 CTTCCAAAGATGTCAACGTATTGTTACAGATCTTGTCCACACGTGCATGCCTCCTAATCCCAT  
 GATGTCTCTAAGCTCTGTCAAAAAATTCAAGAAATTAGGTCTCATCTCATCAAACTTTGTGGTCA  
 AGCTGAGGGGACTTTTAGAGTCACACTTTTCTAAAATTCTTTCCTCCTATGAAAACCCCTTCAAC  
 ATCTTCACATTTTCCCATATTTGACAATTACATCAAACTCAGCTTACTTGAGTACAACATCCTTA  
 CTAAAAACACAACAAATATCCCTAAAAAAATTGCATTTATTGGATCAGGCCCACTACCACTTACCT  
 CACTTGTTTTAGCTACCAAACATCTTAAAACCACTTGTTTTCAAACTATGACATTGATGTGGATG  
 CTAATTCATGGCGTCCGCCCTTGTTGGCGGGCGGATCCAGACATGTCCAGCCGTATGACTTTTCA  
 TACGGCTGACGTGATGGATGTAACGTGTGCCTTGAAAGACTACGATGTAGTCTTCTGGCCGCG  
 TTAGTTGGTATGGACAAAGAGGATAAAGTTAAGGTGGTTGATCATCTAGCTAAATACATGTCTCC  
 AGGGGCTACCCCTGATGCTTAGAAGTGCACATGGTGCACGTGCTTTTCTATACCCCTGTCTAGAT  
 CCTCGGGATCTACGAGGATTTGAGGTACTATCGGTGTACCATCCTACAGATGAAGTGATCAATT  
 CTGTAATAATTGCAAGAAAATTGCCAGTTCCTAGTGTTCCACTACTTGATGGATTGGGTGCCTAT  
 GTGTTACCTAGCAAATGTGCTTGTGCTGAGATTGAGTCTTTCAATCCACTCAATAAGATGAATCT  
 GGTGGAAGAATTTGCTCTGGAGGAGT<sup>Stop</sup>GAGTGAGATTTATGTCTTGTGTTATGTTTCAATAATAAT  
 ATTACTGGAGCACTTCCATTTTTATTGTAATTTGTATCCCTAACTGTTTTATCAGTGTGTCTTATT  
 TGTGTGTCTCAAACTACAAGAAAAAGAAAAAGGCATGAGGCCTTTTGTTAATCTTACAAATTTTA  
 TCTAATATCTCGTGCCCA

sowie Fragmente, Mutanten und Varianten dieser Sequenz.

4. Nicotianamin-Synthasen.

5. Nicotianamin-Synthase nach Anspruch 4 aus Gerste, gekennzeichnet durch folgende Aminosäuresequenz:

MDAQNKEVDALVQKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLGSEA  
 QEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSDMLAAFNDPLDHLGMFPYYSNYINLSKLEYELLARYV  
 PGRHRPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPDAMFDNYDLCSAANDRASKLFRADKDVGAR  
 MSFHTADVADLTGELAAVDVVFLLALVGMAAEDKTKVIAHLGAHMADGAALVVRSAHGHV  
 GFLYPIVDPDIGRGGFEVLAVCHPDDVVNSVIIAHKSKDVHANERPNGVVVDSTRGAVP  
 VVSPPCRFGEMVADVTHKREEFTNAEVA

sowie Fragmente, Varianten und Mutanten dieser Sequenz.

6. Nicotianamin-Synthase nach Anspruch 4 aus Tomate, gekennzeichnet durch folgende Aminosäuresequenz:

MVCPNSNPVVEKVCELYEQISRLNLSPSKDVNVLFDTLVHTCMPPNPIDVSKLCQKIQEIRSHLIKLC  
GOAEGLLSHFSKILSSYENPLQHLHIFPYFDNYIKLSLLEYNLTKNNTNIPKKIAFIGSGPLPLTSLVLA  
TKHLKTTCTFHNYDIDVDANFMASALVAADPDMSSRMTFHTADVMDVTCALKDYDVVFLAALVGMDK  
EDKVKVVDHLAKYMSPGATLMLRSAHGARAFLYPVLDPRDLRGFEVLSVYHPTDEVINSVIIARKLPV  
PSVPLLDGLGAYVLPSKCACAEIHAFNPLNKMNLVEEFALEE\*

sowie Fragmente, Varianten und Mutanten dieser Sequenz.

7. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1-3 oder gegen diese gerichteter Antisense-Oligonukleotide zur Beeinflussung des Nicotianamin-Synthase-Gehalts in Pflanzen.

8. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 und 2 oder gegen diese gerichteter Antisense-Oligonukleotide zur Beeinflussung des Nicotianamin-Synthase-Gehalts in monokotylen Pflanzen.

9. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 und 3 oder gegen diese gerichteter Antisense-Oligonukleotide zur Beeinflussung des Nicotianamin-Synthase-Gehalts in dikotylen Pflanzen.

10. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1-3 zum Aufbau von Vektoren zur Transfektion von Pflanzen.

11. Verwendung der Aminosäure-Sequenzen nach Anspruch 4-6 zum Herbizidtargeting.

12. Transgene Pflanzen, enthaltend DNA-Sequenzen, die Nicotianamin-Synthase kodieren.

13. Transgene Pflanzen, enthaltend DNA-Sequenzen, die Antisense-Sequenzen gegen die Sequenzen nach Anspruch 1-3 enthalten.

14. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1-3 zur mikrobiellen Nicotianamin-Produktion, dadurch gekennzeichnet, daß Vektoren aufgebaut werden, die diese Sequenzen enthalten, ein Transfer in Mikroorganismen wie E. coli erfolgt und diese Mikroorganismen nachfolgend kultiviert werden.





**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/54, 15/82, 9/10, A01H 5/00</b>		<b>A3</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/60107</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	25. November 1999 (25.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE99/01585</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>18. Mai 1999 (18.05.99)</b>		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>198 24 307.3      20. Mai 1998 (20.05.98)      DE</b>			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN FORSCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>23. März 2000 (23.03.00)</b>	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BÄUMLEIN, Helmut [DE/DE]; Mehlinger Strasse 63, D-06449 Aschersleben (DE). GANAL, Martin [DE/DE]; Reuthestrasse 9, D-06507 Rieder (DE). HERBIK, Alexandra [DE/DE]; Pradel-Strasse 8, D-13187 Berlin (DE). LING, Hong-Qing [CN/DE]; Hans-Stubbe-Strasse 15, D-06466 Gatersleben (DE). MOCK, Hans-Peter [DE/DE]; Unterstrasse 14, D-06469 Nachterstedt (DE). STEPHAN, Udo [DE/DE]; Hans-Stubbe-Strasse 16, D-06466 Gatersleben (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: NICOTIANAMINE SYNTHASE GENES, ISOLATION AND USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: NICOTIANAMIN-SYNTHASE-GENE, IHRE ISOLIERUNG UND IHRE VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to nicotianamine synthase genes, the isolation and use thereof. The invention can be used in agriculture and environmental protection. According to the invention, nicotianamine synthases and the genes coding for the latter are isolated and sequenced. Special embodiment examples are based on isolation from barley or tomatoes.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft die Nicotianamin-Synthase-Gene, ihre Isolierung und ihre Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Landwirtschaft und der Umweltschutz. Erfindungsgemäß werden Nicotianamin-Synthasen und die für sie kodierenden Gene isoliert und sequenziert. Spezielle Ausführungsbeispiele gehen von der Isolierung aus Gerste bzw. aus Tomate aus.</p>			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/01585

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SASAKI, T.: "Rice cDNA, partial sequence (E10137_2A)" EMBL ACCESSION NO:C19229, 25 October 1996 (1996-10-25), XP002127290 the whole document	1,2
X	SASAKI, T.: "Rice cDNA, partial sequence (R0168_1A)" EMBL ACCESSION NO:D23792, 29 November 1993 (1993-11-29), XP002127291 the whole document	1,2
X	VYSOTSKAIA, V.S., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T12M4 sequence, complete sequence" EMBL ACCESSION NO:AC003114, 25 November 1997 (1997-11-25), XP002127292 see nt16450-17340	1-6



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2000

Date of mailing of the international search report

04/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/01585

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIGUCHI, K., ET AL.: "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots" PLANT SOIL, vol. 165, 1994, pages 173-179, XP000866258 the whole document	1,4,5
X	HIGUCHI, K., ET AL.: "The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Graminae" PLANT SOIL, vol. 178, 1996, pages 171-177, XP000866267 the whole document	1,4,5, 7-10,12
P,X	MORI, S.: "Hordeum vulgare hvnas6 mRNA for nicotianamine synthase 6, complete cds" EMBL ACCESSION NO:AB011269, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002127293 the whole document -& HIGUCHI, K., ET AL.: "Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phyto siderophores" PLANT PHYSIOLOGY, vol. 119, February 1999 (1999-02), pages 471-479, XP002127294 the whole document	1-6
P,X	GANAL, M.W., ET AL.: "Lycopersicon esculentum chl n gene" EMBL ACCESSION NO:AJ242045, 4 May 1999 (1999-05-04), XP002127295 the whole document -& LING, H.-Q., ET AL.: "Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 96, June 1999 (1999-06), pages 7098-7103, XP002127296 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424	1-6
A	S MORI: "Reevaluation of the genes induced by iron deficiency in barley roots" SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION,JP,TOKYO, no. 43, 1997, page 975-980 XP002076369 ISSN: 0038-0768	1-14
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 99/01585

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LING, H.-Q., ET AL.: "Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 252, 1996, pages 87-92, XP002127297 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,6
A	<p>HIGUCHI, K., ET AL.: "Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant chloronerva" JOURNAL OF PLANT NUTRITION , vol. 19, no. 8-9, 1996, pages 1235-1239, XP000866559 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,6
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198821 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1988-145047 XP002127300 &amp; JP 63 087990 A (MEIJI SEIKA KAISHA), 19 April 1988 (1988-04-19) abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	14
A	<p>SCHOLZ, G., ET AL.: "Nicotianamine - a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: a revieww" JOURNAL OF PLANT NUTRITION, vol. 15, no. 10, 1992, pages 1647-1665, XP000866570 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-14
E	<p>WO 99 57249 A (HIGUCHI KYOKO ;SUZUKI KAZUYA (JP); MORI SATOSHI (JP); NISHIZAWA NA) 11 November 1999 (1999-11-11) the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/01585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 63087990 A	19-04-1988	JP 2010433 C JP 7040950 B	02-02-1996 10-05-1995
WO 9957249 A	11-11-1999	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01585

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SASAKI, T.: "Rice cDNA, partial sequence (E10137_2A)" EMBL ACCESSION NO:C19229, 25. Oktober 1996 (1996-10-25), XP002127290 das ganze Dokument	1,2
X	SASAKI, T.: "Rice cDNA, partial sequence (R0168_1A)" EMBL ACCESSION NO:D23792, 29. November 1993 (1993-11-29), XP002127291 das ganze Dokument	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Januar 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/02/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01585

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VYSOTSKAIA, V.S., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T12M4 sequence, complete sequence" EMBL ACCESSION NO:AC003114, 25. November 1997 (1997-11-25), XP002127292 see nt16450-17340 ---	1-6
X	HIGUCHI, K., ET AL.: "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots" PLANT SOIL, Bd. 165, 1994, Seiten 173-179, XP000866258 das ganze Dokument ---	1,4,5
X	HIGUCHI, K., ET AL.: "The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Graminae" PLANT SOIL, Bd. 178, 1996, Seiten 171-177, XP000866267 das ganze Dokument ---	1,4,5, 7-10,12
P,X	MORI, S.: "Hordeum vulgare hvnas6 mRNA for nicotianamine synthase 6, complete cds" EMBL ACCESSION NO:AB011269, 5. Februar 1999 (1999-02-05), XP002127293 das ganze Dokument -& HIGUCHI, K., ET AL.: "Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 119, Februar 1999 (1999-02), Seiten 471-479, XP002127294 das ganze Dokument ---	1-6
P,X	GANAL, M.W., ET AL.: "Lycopersicon esculentum chl n gene" EMBL ACCESSION NO:AJ242045, 4. Mai 1999 (1999-05-04), XP002127295 das ganze Dokument -& LING, H.-Q., ET AL.: "Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., Bd. 96, Juni 1999 (1999-06), Seiten 7098-7103, XP002127296 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424 ---	1-6
	---	

-/--



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01585

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	S MORI: "Reevaluation of the genes induced by iron deficiency in barley roots" SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION, JP, TOKYO, Nr. 43, 1997, Seite 975-980 XP002076369 ISSN: 0038-0768 ---	1-14
A	LING, H.-Q., ET AL.: "Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 252, 1996, Seiten 87-92, XP002127297 das ganze Dokument ---	3,6
A	HIGUCHI, K., ET AL.: "Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant chloronerva" JOURNAL OF PLANT NUTRITION, Bd. 19, Nr. 8-9, 1996, Seiten 1235-1239, XP000866559 das ganze Dokument ---	3,6
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198821 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B03, AN 1988-145047 XP002127300 & JP 63 087990 A (MEIJI SEIKA KAISHA), 19. April 1988 (1988-04-19) Zusammenfassung ---	14
A	SCHOLZ, G., ET AL.: "Nicotianamine - a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: a review" JOURNAL OF PLANT NUTRITION, Bd. 15, Nr. 10, 1992, Seiten 1647-1665, XP000866570 das ganze Dokument ---	1-14
E	WO 99 57249 A (HIGUCHI KYOKO ;SUZUKI KAZUYA (JP); MORI SATOSHI (JP); NISHIZAWA NA) 11. November 1999 (1999-11-11) das ganze Dokument -----	1-14

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01585

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 63087990 A	19-04-1988	JP 2010433 C	02-02-1996
		JP 7040950 B	10-05-1995
WO 9957249 A	11-11-1999	KEINE	